

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 31420081150622

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**多壁碳纳米管/PLGA 复合膜制备及其对大鼠
MSCs 粘附增殖和成骨分化影响的研究**

**Experimental Study on Nanocomposites of MWCNTs/PLGA
and the Effects on Attachment, Proliferation and
Differentiation of Rat BMSCs on the Nanocomposite films**

林翠琳

指导教师姓名: 张其清 教授/博导

叶社房 副教授

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2011 年 4 月

论文答辩时间: 2011 年 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

聚（乳酸-羟基乙酸）共聚物（poly (lactide-co-glycolide), PLGA）具有良好的生物相容性和生物可降解性，已被广泛用于骨移植替代品。碳纳米管（carbon nanotubes, CNTs），基于一系列在电子、热和机械等方面的特性，在生物医学领域也已成为关注的焦点。鉴于骨髓间充质干细胞（Mesenchymal stem cells, MSCs）具有可获得性、可扩增性和良好的成骨分化潜能可作为较理想的骨组织工程种子细胞。

本文以 PLGA 和多壁碳纳米管（multi-walled CNTs, MWCNTs）为材料，用浓硫酸和浓硝酸的混酸对多壁碳纳米管表面处理得到羧基功能化的多壁碳纳米管（carboxylation multi-walled CNTs, MWCNTs, c-MWCNTs），采用溶剂浇注的方法，制备出一种新型的多壁碳纳米管修饰的 PLGA 复合膜；采用红外光谱（FTIR）、热重分析（TGA）对 c-MWCNTs 进行表征，用透射电镜（TEM）、扫描电镜（SEM）、原子力显微镜（AFM）、X 射线光电子能谱（XPS）和接触角等对复合膜表面进行分析。通过一系列实验评价多壁碳纳米管修饰 PLGA 复合膜的力学性能、体外降解以及蛋白吸附行为。

利用全骨髓贴壁培养法成功分离培养 MSCs。以 PLGA 和 PLGA/MWCNTs 膜为对照，将 MSCs 种植于 PLGA/c-MWCNTs 复合膜上进行细胞相容性评价，用 SEM 观察细胞在支架材料上的黏附情况；分别使用 DAPI 染色、WST-1 检测细胞在膜材料上的粘附和增殖；利用碱性磷酸酶活性（ALP）和茜素红实验对 MSCs 在膜材料上向成骨细胞的分化能力进行评估；采用 RT-PCR 法检测 MSCs 在复合膜上向成骨细胞的分化情况。

研究结果表明，MWCNTs 经过混酸处理后得到的功能化 MWCNTs，即 c-MWCNTs 在溶剂中的分散性明显提高；通过 FTIR 和 TGA 结果显示，c-MWCNTs 表面含有活性功能基团（羧基、羟基等）；TEM 显示，混酸处理的多壁碳纳米管的直径和长度比原始多壁碳纳米管的直径和长度小和短，功能化多壁碳纳米管的端口和侧壁都有 PLGA 包裹。SEM 表征多壁碳纳米管修饰 PLGA 复

合膜显示，混酸处理的多壁碳纳米管在 PLGA 聚合物中分散均匀。XPS 分析表明，各类膜化学组分相似；接触角测试结果显示，复合膜的亲水性得到提高，AFM 结果证实，复合膜表面粗糙度的增加导致复合膜亲水性的提高。力学性能检测结果显示，c-MWCNTs 的复合提高了 PLGA 聚合物的力学强度；体外降解实验结果表明，PLGA 和多壁碳纳米管修饰的 PLGA 膜均具有生物降解性。材料表面的蛋白吸附结果表明，复合膜表面吸附的血清蛋白量比纯 PLGA 膜的蛋白吸附量显著增加。

PLGA 膜、多壁碳纳米管修饰的 PLGA 复合膜分别与 MSCs 进行体外共同培养的结果表明，与单纯 PLGA 膜相比，MSCs 与复合膜表现出更好的细胞亲和性。MSCs 在复合膜表面铺展良好，与复合膜形成紧密结合。碱性磷酸活性和茜素红法检测钙离子以及 RT-PCR 法的实验结果均表明，PLGA/c-MWCNTs 能促进 MSCs 向成骨细胞方向分化。鉴于 PLGA 的易塑形等特点，本文的研究结果可为制备三维 PLGA/c-MWCNTs 复合骨修复支架提供基础。

关键词：PLGA 多壁碳纳米管 骨髓间充质干细胞 复合膜 细胞相容性

Abstract

Poly (lactic acid - glycolic acid) copolymer (PLGA) with good biocompatibility and biodegradability has been widely used in the fabrication of bone graft substitutes. Carbon nanotubes, due to its intrinsic physical and chemistry properties, also hold great promise for use with more and more attention. In view of availability and amplifying *in vitro* for bone mesenchymal stem cells (MSCs), which hold good potential for differentiating into osteoblasts, suggesting that MSCs may be candidate cell source in the field of bone tissue engineering.

In this study, MWCNTs were oxidized in a mixture of nitric and sulfuric acids. Then the carboxylated multi-walled carbon nanotubes (c-MWCNTs) were mixed homogeneously with PLGA to fabricate nanocomposite films by solvent casting technique. Carbon nanotubes were characterized by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and thermogravimetry analysis (TGA). Surface characteristics of nanocomposites were analysed by means of scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), atomic force microscopy (AFM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and static contact angle. Mechanical properties, *in vitro* degradation test and protein adsorption were used to evaluate the nanocomposite films.

We successfully isolated and cultured *in vitro* MSCs from SD rat's bone marrow. MSCs were seeded to PLGA, PLGA/MWCNTs and PLGA/c-MWCNTs films with tissue culture polystyrene as the control. The morphological characteristics of cells on films were observed with SEM and DAPI staining. WST-1 was used to assay the proliferation of cells. The differentiation of MSCs towards to osteoblasts on the films was detected with alkaline phosphatase (ALP) method and calcium concentration. The differentiation of MSCs cultured on different films was assayed by means of the mRNA expression of ALP, OCN and BSP of the cells.

The oxidized MWCNTs were highly dispersed in dichloromethane (DCM). The characterizations of FTIR and TGA confirmed that hydroxyl and carboxyl groups attached to MWCNTs, although the nanotubes structures were damaged a little by TEM assay. SEM and AFM observations revealed that c-MWCNTs gave a better dispersion than unmodified MWCNTs in the PLGA matrix. Addition of c-MWCNTs allowed a better hydrophilicity in the PLGA matrix according to the results of XPS, water contact angle, and the degradation in vitro. The MWCNTs and c-MWCNTs modified PLGA nanocomposite films possessed higher tensile strength than the FDA-approved PLGA, especially the PLGA/c-MWCNTs.

SEM proved that the cells could adhere to and spread on films via cytoplasmic processes. Compared with control groups, MSCs cultured onto PLGA/c-MWCNTs nanocomposites exhibited better adhesion and viability and also displayed significantly higher production levels of ALP and calcium concentration. The MSCs cultured on the nanocomposites in osteogenic medium displayed a significantly higher mRNA expression of ALP, OCN and BSP as compared with the pure PLGA. These results demonstrated that c-MWCNTs modified PLGA films were beneficial for promoting of cell growth and inducing MSCs to differentiate into osteoblasts. This work presented here had potential applications in the development of 3-D scaffolds for bone tissue engineering.

Keyword: Poly(lactic-co-glycolic acid); Multiwalled carbon nanotube; Mesenchymal stem cells; Nanocomposites; Cell compatibility

目 录

摘 要	I
Abstract	III
第一章 绪 论	1
1.1 骨组织工程	1
1.1.1 骨的结构和功能	1
1.1.2 骨组织工程种子细胞	2
1.1.3 骨修复材料	2
1.2 碳纳米管	4
1.2.1 碳纳米管的结构与性能	4
1.2.2 碳纳米管在骨修复材料的应用进展	5
1.2.3 碳纳米管应用存在的问题	6
1.3 PLGA 聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物	9
1.3.1 PLGA 的结构及性能	9
1.3.2 PLGA 在骨修复方面的应用	10
1.4 本课题的研究意义和研究内容	12
1.4.1 研究意义	12
1.4.2 研究内容	12
参考文献	12
第二章 SD 大鼠骨髓间充质干细胞的体外分离培养	19
2.1 材料和仪器	19
2.1.1 实验动物	19
2.1.2 主要试剂和仪器	19
2.2 主要试剂的配制	21
2.3 实验方法	22
2.3.1 MSCs 原代培养	22
2.3.2 MSCs 传代培养	22

2.3.3	细胞冻存	22
2.3.4	细胞复苏	23
2.3.5	MSCs 的形态学观察	23
2.3.6	生长曲线	24
2.3.7	细胞周期分析	25
2.3.8	MSCs 的成骨诱导及鉴定	25
2.4	结果与讨论	26
2.4.1	SD 大鼠 MSCs 原代培养	26
2.4.2	SD 大鼠 MSCs 传代培养	27
2.4.3	生长曲线	28
2.4.4	细胞周期	29
2.4.5	MSCs 的成骨诱导及鉴定	29
2.5	本章小结	31
	参考文献	31
第三章	PLGA/CNTs 复合材料制备及理化性质研究	33
3.1	试剂及仪器	33
3.2	实验方法	35
3.2.1	多壁碳纳米管的酸化	35
3.2.2	多壁碳纳米管修饰的 PLGA 复合膜的制备	35
3.2.3	多壁碳纳米管及其修饰的 PLGA 复合膜的理化表征	35
3.2.4	材料的力学性能检测	37
3.2.5	材料的体外降解实验	37
3.2.6	材料的蛋白吸附观察	37
3.3	结果与讨论	38
3.3.1	多壁碳纳米管的酸化	38
3.3.2	复合材料的形貌表征	40
3.3.3	材料的力学性能检测	46
3.3.4	材料的体外降解实验	47
3.3.5	材料的蛋白吸附	49
3.4	本章小结	50

参考文献	51
第四章 PLGA/CNTs 复合材料的体外细胞相容性研究	54
4.1 试剂和仪器	54
4.2 主要试剂的配制	56
4.3 实验方法	57
4.3.1 膜材料的灭菌及预处理	57
4.3.2 SEM 观察大鼠 MSCs 在膜材料表面的生长	57
4.3.3 DAPI 染色观察大鼠 MSCs 的粘附情况	58
4.3.4 WST-1 分析细胞增殖	58
4.3.5 碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 活性检测	59
4.3.6 茜素红染色及钙含量测定	60
4.3.7 膜材料对大鼠 MSCs 向成骨细胞分化的影响	60
4.4 结果与讨论	63
4.4.1 大鼠 MSCs 在膜材料表面的电镜观察	63
4.4.2 DAPI 染色观察大鼠 MSCs 的粘附情况	64
4.4.3 WST-1 分析细胞增殖	65
4.4.4 碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 活性检测	67
4.4.5 茜素红染色及钙含量测定	68
4.4.6 膜材料对大鼠 MSCs 向成骨细胞分化的影响	70
4.5 本章小结	72
参考文献	72
全文总结与展望	76
全文总结	76
展望	77
硕士期间发表论文	78
致 谢	79

Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
Contents.....	V
Chapter 1 Preface.....	1
1.1 Overview of bone tissue engineering.....	1
1.1.1 Structure and functions of bones	1
1.1.2 Seed cells for bone tissue engineering.....	2
1.1.3 Bone repair materials.....	2
1.2 Carbon nanotube.....	4
1.2.1 Structure and properties of carbon nanotubes	4
1.2.2 Applications of carbon nanotubes for bone repair	5
1.2.3 Problems with using carbon nanotubes	6
1.3 Poly (lactide-co-glycolide), PLGA	9
1.3.1 Structure and properties of PLGA.....	9
1.3.2 Applications of PLGA for bone repair	10
1.4 Significance and contents of this thesis	12
1.4.1 Significance.....	12
1.4.2 Contents	12
Reference.....	12
Chapter 2 Isolation and culture of SD MSCs in vitro	19
2.1 Materials and Instruments	19
2.1.1 Experimental animals	19
2.1.2 Reagents and instruments	19
2.2 Preparation of main reagents	21
2.3 Methods.....	22
2.3.1 Primary culture of MSCs	22

2.3.2	Subculture of MSCs	22
2.3.3	Freeze of MSCs	22
2.3.4	Recovery of MSCs	23
2.3.5	Cell morphology	23
2.3.6	Growth curve of MSCs	24
2.3.7	Cell cycle	25
2.3.8	Osteogenic differentiation and identification of MSCs	25
2.4	Results and Discussion.....	26
2.4.1	Primary culture of MSCs	26
2.4.2	Subculture of MSCs	27
2.4.3	Growth curve of MSCs	28
2.4.4	Cell cycle	29
2.4.5	Osteogenic differentiation and identification of MSCs	29
2.5	Summary.....	31
	Reference.....	31
	Chapter 3 Preparation and Characteristic of nanocomposites	33
3.1	Reagents and Instruments.....	33
3.2	Methods.....	35
3.2.1	Acid treatment of MWCNTs.....	35
3.2.2	Film preparation	35
3.2.3	Characterization	35
3.2.4	Tensile properties	37
3.2.5	In vitro degradation test	37
3.2.6	Protein adsorption study	37
3.3	Results and discussion	38
3.3.1	Acid treatment of MWCNTs.....	38
3.3.2	Morphology of films.....	40
3.3.3	Tensile properties	46
3.3.4	In vitro degradation test	47

3.3.5 Protein adsorption study	49
3.4 Summary.....	50
Reference.....	51
Chapter 4 Cell compatibility of PLGA/CNTs nanocomposites.....	54
4.1 Reagents and Instruments.....	54
4.2 Preparation of main reagents	56
4.3 Methods.....	57
4.3.1 Sterilization and Pretreatment of films	57
4.3.2 SEM.....	57
4.3.3 DAPI staining	58
4.3.4 WST-1	58
4.3.5 Alkaline phosphatase (ALP) assay.....	59
4.3.6 Alizarin red S staining and Calcium content analysis	60
4.3.7 Effect of films on the osteogenic differentiation of MSCs	60
4.4 Results and Discussion.....	63
4.4.1 SEM.....	63
4.4.2 DAPI staining.....	64
4.4.3 WST-1	65
4.4.4 Alkaline phosphatase (ALP) assay	67
4.4.5 Alizarin red S staining and Calcium content analysis	68
4.4.6 Effect of films on the osteogenic differentiation of MSCs	70
4.5 Summary.....	72
Reference.....	72
Conclusion and Prospect	76
Conclusion.....	76
Prospect.....	77
Research achievements	78
Acknowledgements	79

第一章 绪 论

1.1 骨组织工程

组织工程学是 1987 年美国科学基金会提出的, 定义为: 应用生物学和组织工程学的原理, 将体外培养的高浓度的种子细胞种植于天然或人工合成的细胞外基质载体上, 然后移植于体内, 达到形成新的有功能的组织的目的^[1]。骨组织工程学作为组织工程学研究的一个重要组成部分, 已被认为是目前最有前途和可行性的一个领域, 为临床治疗骨缺损提供了新的方法。以种子细胞与生物材料结合构成的细胞型组织工程人工骨已成为修复骨缺损的理想方法。

骨组织是临床上能以再生方式完成损伤修复(骨折愈合等)的少数组织之一, 其中最关键的是膜引导骨组织再生术的实际应用。膜引导骨组织再生术的原理是利用生物膜的物理屏障功能将骨病缺损区与周围组织隔离, 创造一个相对封闭的组织环境, 阻止上皮和纤维组织长入骨创区, 保证理想的骨再生愈合空间, 保护骨组织细胞增殖修复, 促进骨创区良好快捷地愈合, 使骨组织的再生功能得到最大程度的发挥^[2-3]。这种由膜引导的骨修复过程属于自然的骨再生过程, 利用组织工程技术, 选择适合的细胞和膜材料, 为骨重建外科开辟新的治疗途径。

1.1.1 骨的结构和功能

骨组织主要由骨基质和骨细胞构成。骨基质为骨组织的基础, 其化学成分包括有机成分和无机成分两种。有机成分包括大量的骨胶纤维和少量无定形基质。骨胶纤维占有机质的 90%, 主要由 I 型胶原蛋白组成, 基质呈凝胶状, 主要含中性和弱酸性的糖胺多糖以及多种糖蛋白, 最重要的是骨钙蛋白; 无机成分主要是呈细针状的羟基磷灰石, 长约 10~20 nm, 规则地沿胶原纤维长轴排列。图 1.1 为骨的结构示意图。由于有机成分和无机成分紧密结合, 使骨成为很坚硬的组织。

骨细胞是骨组织中含量最多的细胞, 包括骨原细胞、成骨细胞、骨细胞及破骨细胞四种。骨原细胞是骨组织中的干细胞, 当骨组织生长或重建时, 它能分化成为骨细胞。成骨细胞有分泌骨质有机成分的功能。破骨细胞具有溶解吸收骨质的作用。

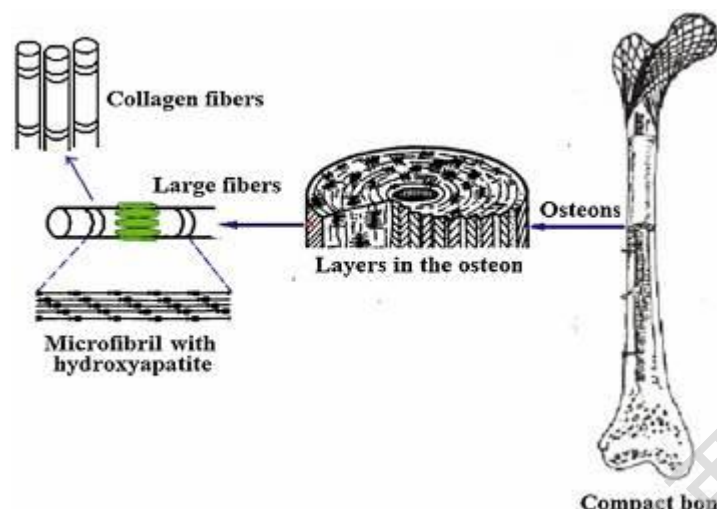
图 1.1 骨的结构示意图^[4]

Fig. 1.1 The nanostructured hierarchal self-assembly of bone

1.1.2 骨组织工程种子细胞

构建理想的组织工程化骨其前提是要有生物相容性良好的种子细胞和适合的支架材料，随着干细胞研究的不断深入，给组织工程种子细胞的选择带来了新的希望。骨髓间充质干细胞（Mesenchymal stem cells, MSCs）是多潜能干细胞，具有分化成骨、软骨、脂肪、肌腱、成纤维及神经星状等细胞的潜能^[5]。由于 MSCs 可以通过体外贴壁分离培养，扩增迅速，体外传代 12 次后仍能保持正常的染色体组型和端粒酶活性，具有低免疫原性，组织相容性好。目前，MSCs 已经成为比较理想的骨组织工程种子细胞^[6-7]。

1.1.3 骨修复材料

由于骨坏死、肿瘤、创伤、感染及先天畸形等多种疾病引起的骨缺损常见于临床，但治疗困难。目前临床上治疗骨缺损常用的方法有自体骨移植和异体骨移植。自体骨易被患者接受，但存在二次手术的损伤和痛苦，自体骨移植能最大限度地减少受区反应，但取骨量有限，会造成供区创伤等一系列潜在的并发症^[8]。异体骨取材简便，但是有免疫排斥反应，可能会传播疾病^[9-10]。近二十年来，应用生物学和组织工程学的原理，将体外培养的高浓度的种子细胞种植于天然或人

工合成的细胞外基质载体上，并复合诱导因子，然后移植于体内，构成的细胞型组织工程人工骨为临床治疗骨缺损提供了新的方法^[11]。

骨组织工程支架材料是种子细胞外基质（ECM）的替代物，引导细胞增殖分化与新骨生成，是组织工程化骨的重要组成部分。理想的组织工程化骨支架材料的基本要求有^[12-13]：①良好的生物相容性；②良好的生物降解性和降解速率可控性；③维持复合的种子细胞形态和表型，并增进细胞的黏附与增殖；④具有三维多孔且互通的网隙结构；⑤可塑性和一定的力学性能。目前，骨组织工程支架材料根据来源主要分为天然生物衍生材料和人工合成材料^[14]。

1.1.3.1 天然生物衍生材料

天然生物衍生材料包括胶原、纤维蛋白、珊瑚、藻酸盐、几丁质、氨基葡聚糖、脱钙骨基质、骨基质明胶和经物理化学处理的异体或自体骨等。胶原是常用的天然聚合物之一，在体内以胶原纤维的形式存在。天然生物衍生材料抗原性较弱，其亲水性、生物相容性及细胞亲和性较好，且其降解产物可以被机体完全吸收。此外，天然生物材料来源丰富，制备简便，并在功能适应性、组织相容性、理化性能、生物降解性、造价等方面优于人工合成材料。但其缺点是力学强度和加工性能较差，降解时间不能精确计算，而且其品质会因原料的来源、产地不同而不同，故质量重复性差。

1.1.3.2 人工合成材料

人工合成材料包括金属材料、可降解高分子材料、生物陶瓷类材料等。金属材料的强度和韧性较高、耐磨性、耐腐蚀性、可锻性和再现性好，可浇铸成型且不降低强度。但将其植入人体后，仍存在许多问题，往往植入的金属材料并未像设想的那样完全发挥作用，相反还产生或多或少的副作用，给人体带来不适。可降解高分子材料表面性能以及生物降解速率都可进行调节，产品的质量易标准化，有利于大规模生产。但亲水性差，细胞吸附力较弱，机械强度不足^[15]。生物陶瓷类材料与人骨组织无机组成成分相类似，具有优异的骨传导性能，可不同程度地整合入宿主骨。但也存在脆性大，体内降解不易调节等不足。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库